

Possible relación de la quinasa ligada a integrinas (ILK) con el receptor de Hidrocarburos Aromáticos (AhR) en la sarcopenia asociada a la Enfermedad renal crónica (ERC)

Sergio García-Villoria^{1,2}, Alba Silvestre-Vargas^{1,2}, Marta Vázquez-Duro^{1,2}, Mercedes Grieria-Merino^{1,3}, María Martos-Elvira^{1,2}, Ariadna Moreno-Piedra^{1,2}, Patricia Martínez-Miguel⁴, Sergio de Frutos-García^{1,2}, Diego Puyol-Rodríguez^{2,4,5}, Laura Calleros-Basilio^{1,2}

¹ Departamento de Biología de Sistemas, Universidad de Alcalá; Fundación Renal Iñigo Álvarez de Toledo (FRIAT), Madrid

² Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), RICORS2040-RENAL de Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), INNORENCM, Madrid

³ Graphenano Medical Care S.L., Alcalá de Henares

⁴ Unidad de Nefrología, Hospital Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares
⁵ Departamento de Medicina y especialidades médicas, Universidad de Alcalá, Fundación para la investigación biomédica Hospital Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Fundación Renal Iñigo Álvarez de Toledo (FRIAT), Madrid

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En las etapas avanzadas de la enfermedad renal crónica (ERC) un 25% de los pacientes padecen sarcopenia, entendido como la pérdida de masa y funcionamiento muscular. El receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR) actúa como un factor transcripcional y puede ser activado por toxinas urémicas acumuladas durante ERC, como el indoxil sulfato (IS). AhR está vinculado con la degeneración muscular y podría ser un vínculo entre sarcopenia y ERC, aunque el mecanismo de traslocación de AhR al núcleo en condiciones urémicas no está completamente elucidado. La quinasa ligada a integrinas (ILK) es un posible candidato por ser una proteína fundamental para la organización y funcionalidad del citoesqueleto, y la fosforilación de ciertas proteínas. Aquí utilizamos un modelo in vivo de ERC y modelos in vitro de células de músculo esquelético, para analizar el posible papel de ILK en la traslocación nuclear del AhR y en los consecuentes cambios de marcadores de diferenciación miogénica y de transdiferenciación del músculo esquelético durante la sarcopenia asociada a la ERC.

Resultados

IS aumentó la traslocación al núcleo y la actividad de AhR en C2C12, medida por un aumento en la expresión de su efecto CyP1A1. El mecanismo implica la fosforilación de substratos de ILK y la polimerización de actina. Constatamos la participación de ILK en estos procesos porque su silenciamiento redujo la polimerización de actina e impidió el aumento de CyP1A1. Respecto a las consecuencias funcionales, IS redujo la expresión de factores de diferenciación miogénica (MyOD y MyOG) y aumentó marcadores adipocitarios (FABP4 y PPARy). La deleción de ILK revirtió estos marcadores de diferenciación y transdiferenciación. En el modelo in vivo de ERC, la expresión de ILK y CyP1A1 aumentó en los gastrocnemios de los animales y se redujo la fuerza muscular, en tanto que en los cKD-ILK se preservó la fuerza y disminuyó la expresión de CyP1A1.

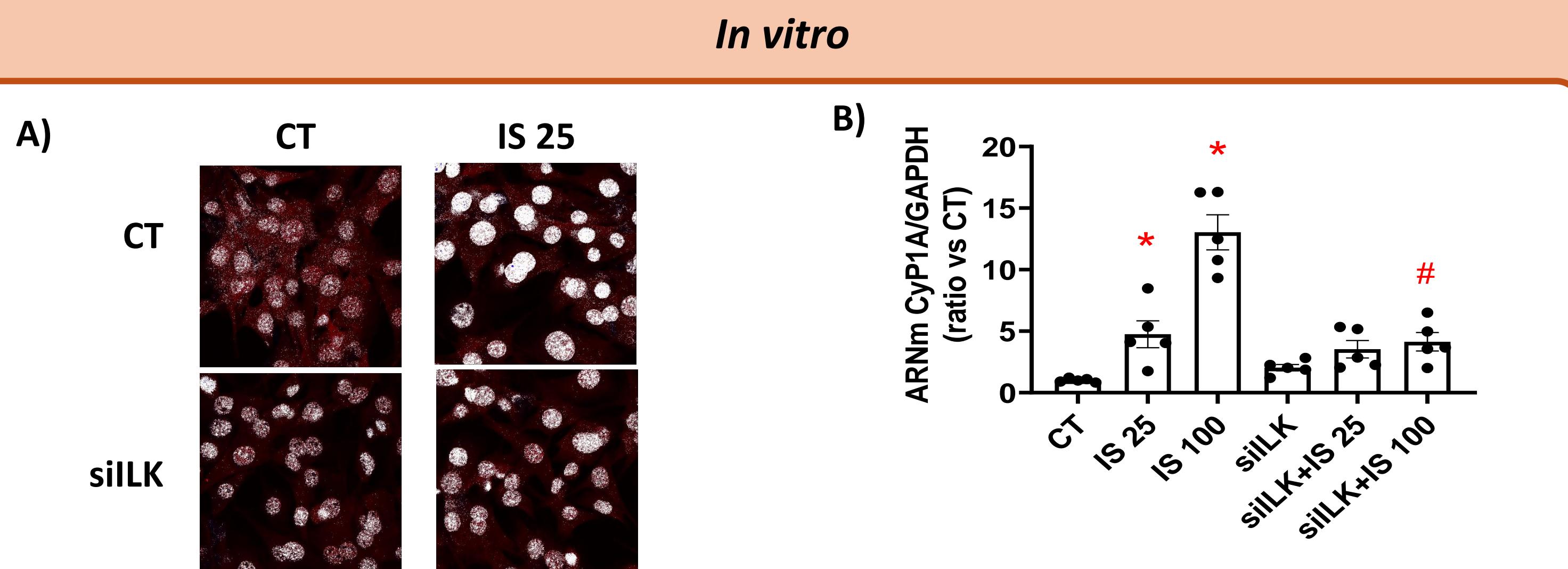


Figura 1. El silenciamiento de ILK reduce la traslocación de AhR y la expresión de su efecto CyP1A1 causado por IS. Mioblastos transfecados con siRNAs de ILK (siILK) o inespecíficos (CT) tratados IS 25 o 100 μg/ml. A) Imágenes representativas de confocal que muestran co-localización (blanco) de AhR (rojo) en el núcleo (azul) a los 30 minutos de tratamiento. B) expresión de ARNm de CyP1A1 normalizadas vs GAPDH como endógeno tras 48 h de tratamiento. Media ± SEM, *p<0.05 vs CT; #p<0.05 vs IS.

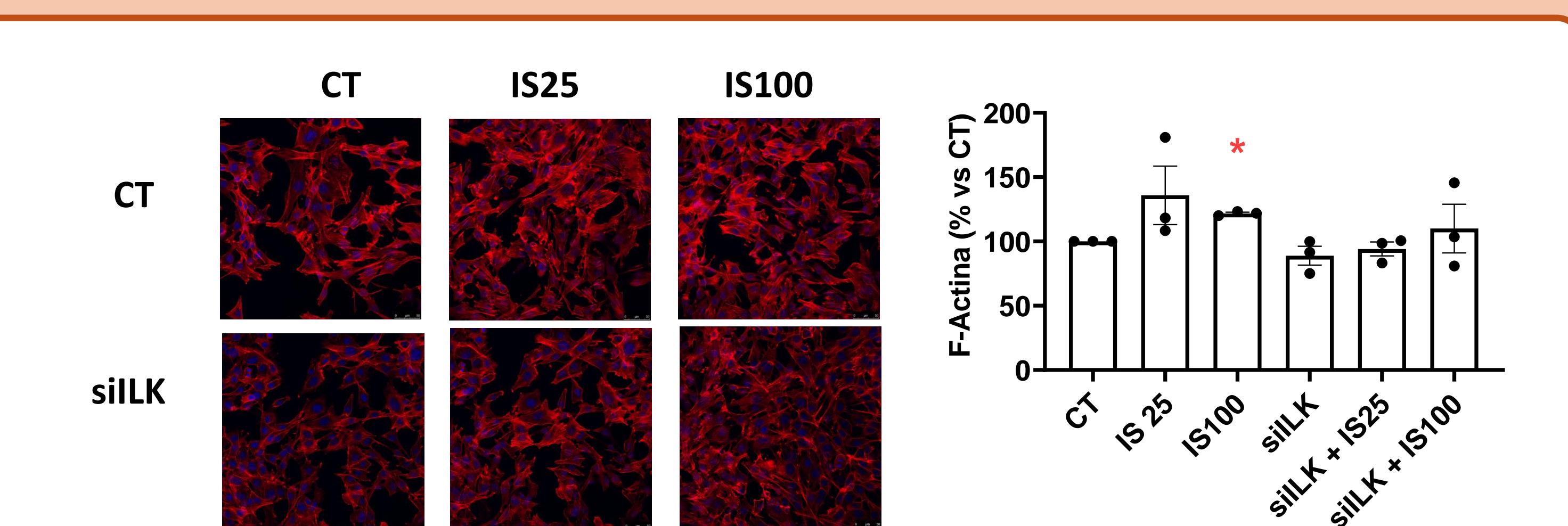


Figura 2. El silenciamiento de ILK disminuye la polimerización del citoesqueleto de actina causado por IS. Imágenes representativas de confocal de la polimerización de F-actina (faloidina roja) y núcleos (DAPI, azul) en mioblastos C2C12 transfecados con siRNAs de ILK (siILK) o inespecíficos (CT) y tratados con IS 25 o 100 μg/ml. Media ± SEM, *p<0.05 vs CT.

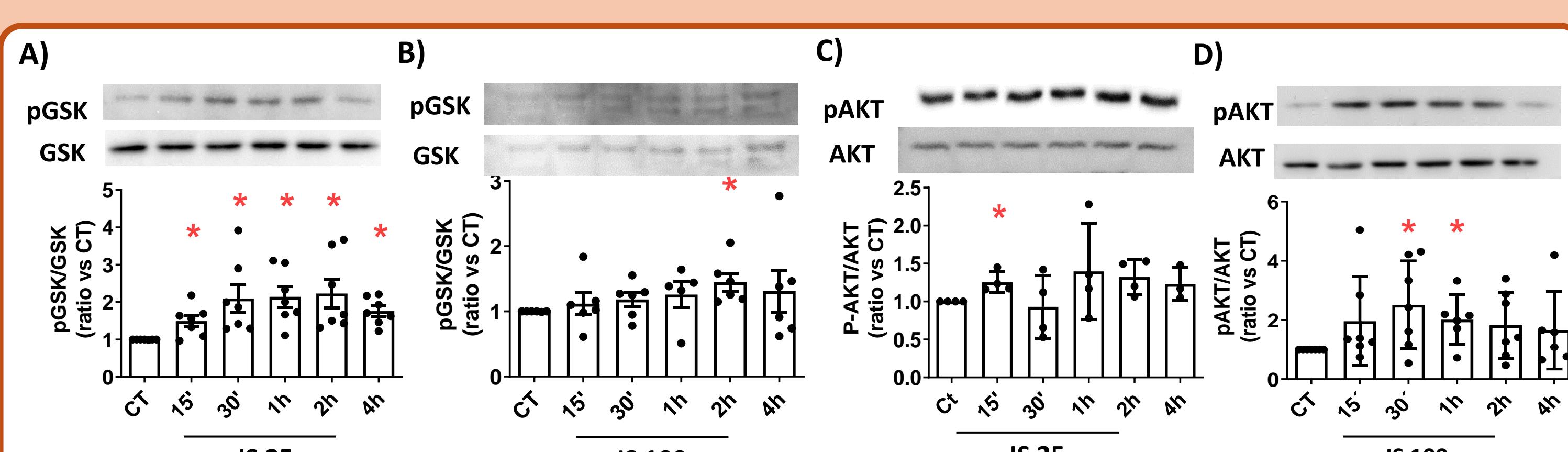


Figura 3. El IS induce la actividad de ILK sobre sus sustratos GSK y AKT. Niveles proteicos de GSK-3β fosforilado en ser9 (pGSK) vs total (GSK) en células tratadas con IS 25 o 100 μg/ml (A y B respectivamente) y AKT fosforilado en ser473 (pAKT) vs total (AKT) en células tratadas con IS 25 o 100 μg/ml (C y D, respectivamente). Media ± SEM, *p<0.05 vs CT.

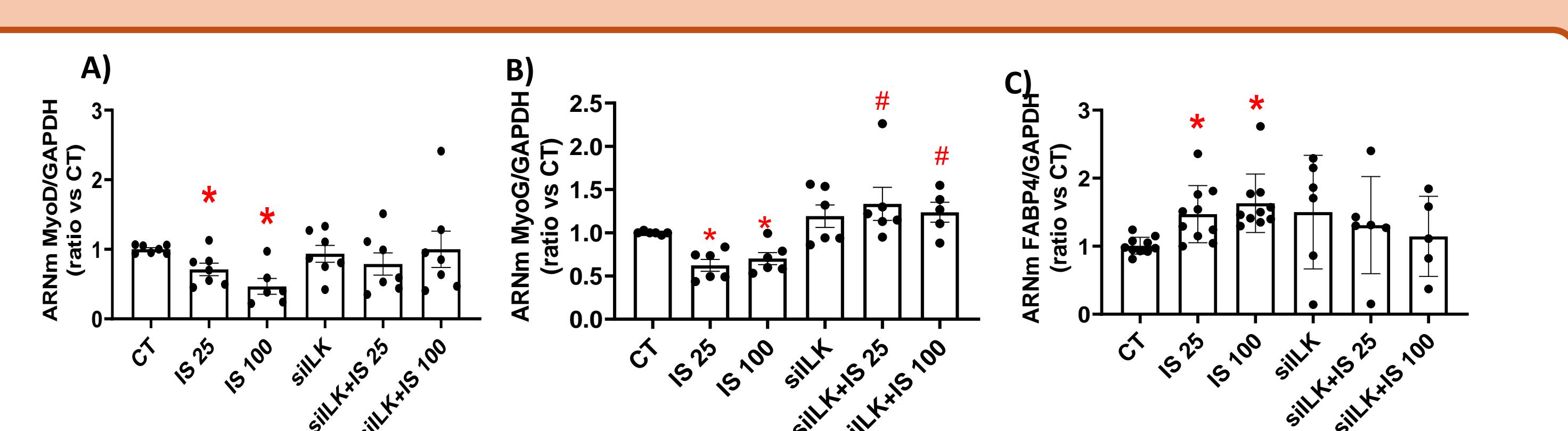


Figura 4. El silenciamiento de ILK revierte los cambios de expresión de marcadores de diferenciación muscular y transdiferenciación adipocitaria causados por IS. Niveles de expresión ARNm de marcadores de diferenciación miogénica A) MyoD y B) MyoG, y de transdiferenciación adipocitaria C) FABP4, en mioblastos C2C12 transfecados con siRNAs de ILK (siILK) o inespecíficos (CT) y tratados con IS 25 o 100 μg/ml. Media ± SEM, *p<0.05 vs CT; #p<0.05 vs IS.

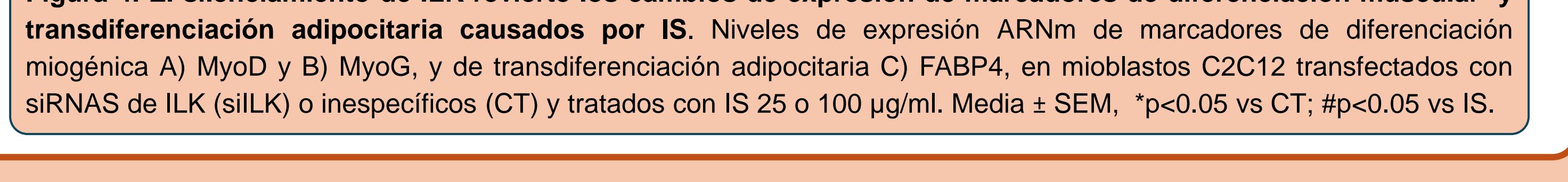


Figura 5. La ERC induce el aumento de expresión de ILK en el músculo esquelético. La expresión de ARNm de ILK en el gastrocnemio se evaluó por RT-qPCR, se normalizó vs GAPDH como endógeno. Círculos rojos=hembras. Círculos negros=machos. Media ± SEM, *p<0.05 vs WT; #p<0.05 vs WTA.

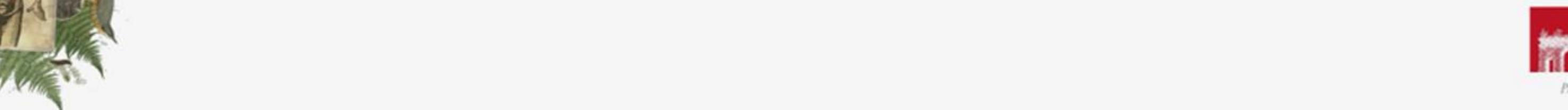


Figura 6. La deleción condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético reduce la actividad de AhR causada por ERC. La expresión en el gastrocnemio de ARNm del efecto de AhR, CyP1A1 se normalizó vs GAPDH como endógeno. Círculos rojos= hembras. Círculos negros= machos. Media ± SEM, *p<0.05 vs WT; #p<0.05 vs WTA.

Figura 7. La deleción condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético previene la perdida de fuerza de agarre causada por ERC. Prueba de fuerza de agarre medida en Newtons (N). Círculos negros=machos. Media ± SEM, *p<0.05 vs WT.

Figura 7. La deleción condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético previene la perdida de fuerza de agarre causada por ERC. Prueba de fuerza de agarre medida en Newtons (N). Círculos negros=machos. Media ± SEM, *p<0.05 vs WT.

Figura 7. La deleción condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético previene la perdida de fuerza de agarre causada por ERC. Prueba de fuerza de agarre medida en Newtons (N). Círculos negros=machos. Media ± SEM, *p<0.05 vs WT.

Figura 7. La deleción condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético previene la perdida de fuerza de agarre causada por ERC. Prueba de fuerza de agarre medida en Newtons (N). Círculos negros=machos. Media ± SEM, *p<0.05 vs WT.

Figura 7. La deleción condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético previene la perdida de fuerza de agarre causada por ERC. Prueba de fuerza de agarre medida en Newtons (N). Círculos negros=machos. Media ± SEM, *p<0.05 vs WT.

Figura 7. La deleción condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético previene la perdida de fuerza de agarre causada por ERC. Prueba de fuerza de agarre medida en Newtons (N). Círculos negros=machos. Media ± SEM, *p<0.05 vs WT.

Figura 7. La deleción condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético previene la perdida de fuerza de agarre causada por ERC. Prueba de fuerza de agarre medida en Newtons (N). Círculos negros=machos. Media ± SEM, *p<0.05 vs WT.

Figura 7. La deleción condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético previene la perdida de fuerza de agarre causada por ERC. Prueba de fuerza de agarre medida en Newtons (N). Círculos negros=machos. Media ± SEM, *p<0.05 vs WT.

Figura 7. La deleción condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético previene la perdida de fuerza de agarre causada por ERC. Prueba de fuerza de agarre medida en Newtons (N). Círculos negros=machos. Media ± SEM, *p<0.05 vs WT.

Figura 7. La deleción condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético previene la perdida de fuerza de agarre causada por ERC. Prueba de fuerza de agarre medida en Newtons (N). Círculos negros=machos. Media ± SEM, *p<0.05 vs WT.

Figura 7. La deleción condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético previene la perdida de fuerza de agarre causada por ERC. Prueba de fuerza de agarre medida en Newtons (N). Círculos negros=machos. Media ± SEM, *p<0.05 vs WT.

Figura 7. La deleción condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético previene la perdida de fuerza de agarre causada por ERC. Prueba de fuerza de agarre medida en Newtons (N). Círculos negros=machos. Media ± SEM, *p<0.05 vs WT.

Figura 7. La deleción condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético previene la perdida de fuerza de agarre causada por ERC. Prueba de fuerza de agarre medida en Newtons (N). Círculos negros=machos. Media ± SEM, *p<0.05 vs WT.

Figura 7. La deleción condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético previene la perdida de fuerza de agarre causada por ERC. Prueba de fuerza de agarre medida en Newtons (N). Círculos negros=machos. Media ± SEM, *p<0.05 vs WT.

Figura 7. La deleción condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético previene la perdida de fuerza de agarre causada por ERC. Prueba de fuerza de agarre medida en Newtons (N). Círculos negros=machos. Media ± SEM, *p<0.05 vs WT.

Figura 7. La deleción condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético previene la perdida de fuerza de agarre causada por ERC. Prueba de fuerza de agarre medida en Newtons (N). Círculos negros=machos. Media ± SEM, *p<0.05 vs WT.

Figura 7. La deleción condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético previene la perdida de fuerza de agarre causada por ERC. Prueba de fuerza de agarre medida en Newtons (N). Círculos negros=machos. Media ± SEM, *p<0.05 vs WT.

Figura 7. La deleción condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético previene la perdida de fuerza de agarre causada por ERC. Prueba de fuerza de agarre medida en Newtons (N). Círculos negros=machos. Media ± SEM, *p<0.05 vs WT.

Figura 7. La deleción condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético previene la perdida de fuerza de agarre causada por ERC. Prueba de fuerza de agarre medida en Newtons (N). Círculos negros=machos. Media ± SEM, *p<0.05 vs WT.

Figura 7. La deleción condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético previene la perdida de fuerza de agarre causada por ERC. Prueba de fuerza de agarre medida en Newtons (N). Círculos negros=machos. Media ± SEM, *p<0.05 vs WT.

Figura 7. La deleción condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético previene la perdida de fuerza de agarre causada por ERC. Prueba de fuerza de agarre medida en Newtons (N). Círculos negros=machos. Media ± SEM, *p<0.05 vs WT.

Figura 7. La deleción condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético previene la perdida de fuerza de agarre causada por ERC. Prueba de fuerza de agarre medida en Newtons (N). Círculos negros=machos. Media ± SEM, *p<0.05 vs WT.

